

非洲猪瘟病毒的快速检测方法研究进展

王梓莹¹, 但 琨², 施远国², 阚式绂², 钟雷响², 何庆华^{1*}

(1. 深圳大学化学与环境工程学院, 深圳 518071; 2. 深圳市农产品质量安全检验检测中心, 深圳 518070)

摘 要: 非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒感染引起的一种高度接触性传染病, 对养猪业危害严重。世界动物卫生组织将其列为法定呈报的动物疫病, 我国将其列为一类动物传染病。由于此病目前无有效疫苗进行预防, 为防止疫病的传播, 可靠、快速的早期诊断对于实施严格的卫生和生物安全措施必不可少。本文就非洲猪瘟的病原学检测和血清学抗体检测技术及其应用进行了综述, 以期为非洲猪瘟的快速诊断提供技术参考。

关键词: 非洲猪瘟; 快速检测; 病原学检测; 血清学抗体检测

Research progress on rapid detection methods of African swine fever virus

WANG Zi-Ying¹, DAN Kun², SHI Yuan-Guo², KAN Shi-Fu², ZHONG Lei-Xiang², HE Qing-Hua^{1*}

(1. College of Chemistry and Environmental Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518071, China; 2. Agricultural Product Quality Safety Inspection and Testing Center of Shenzhen, Shenzhen 518101, China)

ABSTRACT: African swine fever (ASF) is a highly contagious disease caused by African swine fever virus (ASFV) infection, which is severely harmful to pig industry. ASF is one of legally reported animal diseases listed by Office International des Epizooties and the class one of animal infectious disease placed by China. Since there is currently no effective vaccine against the disease, in order to prevent ASF, the reliable and rapid early diagnosis is essential for the implementation of strict health and biosecurity measures due to no effective vaccine. This paper reviewed the pathogen detection, serological antibody detection and its application of ASF, in order to provide technical reference for the rapid diagnosis of ASF.

KEY WORDS: African swine fever; rapid detection; etiological detection; serological antibody detection

1 引 言

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的家猪和野猪的一种高度接触性、致死性传染病, 可表现为最急性、急性、亚急性和慢性 4 种形式。ASFV 属非洲猪瘟病毒科, 是虫媒病毒中唯一的 DNA 病毒^[1], 可通过软蜱传播^[2,3]。ASFV

有 24 个基因型^[4], 我国流行毒株为基因 II 型血清 8 群^[5]。病毒粒子直径 175~215 nm^[6,7], 呈 20 面体对称, 基因组为双股线状 DNA, 大小为 170~190 kb, 病毒有双层囊膜。我国科学家团队采用冷冻电镜单颗粒三维重构的方法首次解析了 ASFV 全颗粒的三维结构, 阐明了 ASFV 独有的 5 层(外膜、衣壳、双层内膜、核心壳层和基因组)结构特征, 包含 3 万余种蛋白亚基, 组装成直径约 280 nm 的球形颗粒,

基金项目: 深圳市科技创新委员会基础研究项目(JCYJ20180305125139107, GRCK2017081809101684)、深圳市市场监督管理局深圳市地方标准制修订计划项目(201904, 201905)、深圳大学 2020 年研究生创新发展基金项目(202011)

Fund: Supported by Basic Research Program of Shenzhen Municipal Government (JCYJ20180305125139107, GRCK2017081809101684), the Food Safety Foundation of Market and Quality Supervision Commission of Shenzhen Municipality (201904, 201905) and Postgraduate Innovation and Development Fund Project of Shenzhen University in 2020 (202011)

*通讯作者: 何庆华, 副教授, 主要研究方向为营养与食品安全。E-mail: Qinghua.he@szu.edu.cn

*Corresponding author: HE Qing-Hua, Associated Professor, Department of Food Science and Engineering, College of Chemistry and Environmental Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518071, China. E-mail: Qinghua.he@szu.edu.cn

是目前解析近原子分辨率结构的最大病毒颗粒^[8]。ASFV 病毒粒子基因组大, 基因易变异, 病毒蛋白种类多, 存活力强, 可通过多种方式和途径进行有效传播, 这是导致 ASFV 在染疫国家和地区常呈地方性流行的重要原因之一^[9]。

ASF 自 1921 年首次在肯尼亚被发现以来, 广泛流行于全球多个国家和地区^[10,11]。从 2018 年在沈阳首次被发现以来^[12,13], 对我国养猪业造成了重创^[14]。而 ASF 疫苗研发近百年来一直尚未攻克, 难点主要包括: 第一, 基因组庞大复杂且变异性高, 导致病毒结构完整耐受力强难以被杀灭, 并变异形成复杂病毒家族难以形成中和抗体; 第二, ASFV 具有免疫逃逸机制, 可通过不同机制逃逸宿主先天免疫系统, 如 I 型干扰素应答、细胞凋亡和炎症反应^[15]; 第三, 病毒-宿主相互作用的机制不清楚^[16], 病毒入侵机制了解也有限, 需要鉴定病毒入侵的细胞受体为研发抗 ASF 疫苗提供靶标^[17]。ASFV 疫苗研发难度极大, 目前尚无上市产品。因此, 早期诊断和现场快速检测对 ASF 的防控显得尤为重要。本文对快速诊断技术在 ASFV 检测中的应用进行了综述, 对病原学检测和血清学抗体检测的原理以及优缺点进行了总结, 以期为非洲猪瘟的快速诊断提供技术参考。

2 病原学检测技术

2.1 病毒分离培养

病毒分离鉴定是 ASF 诊断的经典方法, 将临床疑似 ASFV 样品接种于猪原代细胞、单核细胞或巨噬细胞, 获得病毒的增殖, 然后对分离的毒株进行鉴定。在出现红细胞吸附现象 48~72 h 后, 若发生细胞病变, 则说明检测样品中存在 ASFV。1960 年, Malmquist 等^[18]首次用猪骨髓细胞和血液白细胞成功分离到 ASFV, 随后该技术广泛应用于 ASFV 的分离。

2.2 荧光抗体试验

荧光抗体试验(fluorescent antibody test, FAT)是常用的抗原检测方法之一, 其原理是使用异硫氰酸荧光素结合的特异性抗体检测猪组织/细胞内的 ASFV^[19]。FAT 对急性 ASF 病例具有快速、准确和经济的特点。但 FAT 必须通过显微观察感染脏器涂片或薄层冷冻切片上的病毒抗原实现, 因此不能用于现场检测。另外, FAT 对检测人员和仪器设备的要求也较高, 目前常作为检测 ASFV 的辅助方法。

2.3 红细胞吸附

红细胞吸附(haemadsorption, HAD)是病毒感染巨噬细胞并在其中复制, 导致 HAD 的一种自然现象。猪的红细胞能够吸附在感染 ASFV 的单核细胞, 或巨噬细胞表面, 因而在出现细胞病变效应之前可形成特征性的玫瑰花环。1960 年, Malmquist 首先发现了病毒感染猪白细胞的培养物后出现了 HAD 的反应, 从而建立了 ASFV 的 HAD 实验

方法^[18]。HAD 实验是世界动物卫生组织(Office International des Epizooties, OIE)推荐的病毒鉴定方法之一, 实验时间需要 3~10 d, 敏感度大约为 92%, 由于非 HAD 毒株的存在, 并不适用于所有 ASFV 的检测, 目前该方法逐渐被聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)所替代。

2.4 病毒核酸检测

ASFV 的核酸检测方法主要有 PCR、荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR)、微滴数字 PCR(droplet digital PCR, ddPCR)、环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)等。

2.4.1 PCR

PCR 是目前 ASFV 最常用的实验室检测方法, 该方法有简单快速、灵敏度高、特异性强, 对标本纯度要求低的优点, 已广泛用于 ASF 的现场诊断, 适合用于非疫区国家的疫情监测和产品入关检疫。该技术通常是根据 *B646l* 基因的高度保守区来设计引物, 能够检测出不同基因型的 ASFV。引物的位置和碱基的组成不同, PCR 的扩增效率也不同。Basto 等^[20]建立巢式 PCR 不仅可以检测组织、血液样品和培养物, 还可以检测昆虫软体体内所带的 ASFV, 其敏感性高于 OIE 推荐的 PCR 检测方法。曾少灵等^[21]基于 ASFV 结构蛋白基因 *Vp73* 序列设计特异性检测引物, 与 OIE 推荐用于检测 ASFV 的实时荧光 PCR 和普通 PCR 方法进行比对, 结果表明特异性与 OIE 的 2 种检测方法相当, 灵敏度与 OIE 的荧光 PCR 方法相当。普通 PCR 反应完成后, 产物需要进行琼脂糖核酸电泳观察有无特异性条带, 此过程需要开盖, 容易造成交叉污染, 导致假阳性结果的出现。在临床样品中有多种成分通过与 PCR 反应组分发生作用, 从而抑制 PCR 扩增反应, 造成假阴性的结果。血红素及其代谢物可抑制 DNA 聚合酶的活性, 痰液中的酸性多糖、糖蛋白组分是聚合酶的抑制因子^[22]。因此, 在进行 PCR 扩增前, 必须对样品进行预处理。

2.4.2 qPCR

qPCR 法与传统的定量技术(如半定量 PCR、竞争定量 PCR 等)相比, 具有重复性好、特异灵敏、定量准确、操作简便, 以及对样品污染小和自动化程度高等优点。2002 年, King 等^[23]建立了针对 *P72* 基因的 qPCR, 而且引物和探针序列已被 OIE 作为推荐序列。Tignon 等^[24]基于 *P72* 基因建立的方法, 其敏感性高于 OIE 推荐的常规 PCR 和实时荧光定量 PCR。Luo 等^[25]建立了一种改进的 PCR 检测方法, 用于 ASFV 的灵敏和通用检测, 结果表明此方法比 2 种 OIE 验证的 PCR 分析更灵敏。张彩虹等^[26]根据 ASFV 保守的基因序列建立了一种无需提取核酸, 直接从样品中进行目的基因扩增的可快速检测 ASFV 的直扩 qPCR 方法。对

10 倍梯度稀释的 ASFV 灭活抗原的检测敏感性可达 1×10^{-6} , 与 OIE 推荐的传统的 qPCR 的检测敏感性相当, 可在 60 min 内完成对样品的检测。Wang 等^[27]建立了一种针对 P72 基因采用冻干粉试剂的 qPCR 方法, 灵敏度为 100 拷贝, 比 OIE 推荐的 qPCR 测定法高 10 倍。

OIE 推荐的 TaqMan qPCR, 检测方法准确度高, 但仅以表达结构蛋白 P72 的 *B646l* 基因为靶标, 相对单一, 故开发新型的 ASFV 早期基因诊断靶标有助于尽早确定疫情。崔贝贝等^[28]基于 *E184l* 基因序列建立了 TaqMan qPCR 方法, 该方法设计的引物具有高度特异性, 标准曲线的线性相关系数为 0.992, 对 ASFV 核酸最低检测限为 1.51 拷贝。崔贝贝等^[29]也根据 ASFV 早期表达基因 *K196r* 基因序列构建了 TaqMan qPCR 方法, 方法的标准曲线具有良好的线性关系 ($r^2 = 0.998$), 对 ASFV 最低检测限为 1.3 拷贝。多重 PCR 反应具有高效性、系统性、经济简便等优点。王建华等^[30]以 *Cp530r* 基因和 *Hp-prrsv Nsp2* 基因为靶序列分别设计特异性引物和 TaqMan-MGB 探针, 建立了一种二重 qPCR 检测 ASFV 和高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的方法, 最低检出限分别为 61 和 41 拷贝, 可以进行快速、敏感和特异的鉴别工作。

2.4.3 ddPCR

ddPCR 是一种对核酸分子进行绝对定量的技术, 其原理是通过极度稀释实现理论上的单分子扩增, 然后用终点法 PCR 和泊松分布计算出起始模板绝对含量。邬旭龙等^[31]针对 *K205r* 基因建立了 ddPCR 检测方法, 最低检测限度可达到 0.36 拷贝, 检测灵敏度是 qPCR 的 10 倍, 也不与其他猪常见病毒发生交叉反应, 具有很高的特异性和重复性。原霖等^[32]建立的 ddPCR 方法, 最低检测限可达 0.8 拷贝, 敏感性高于 qPCR 方法, 不与猪常见的 6 种病毒发生交叉反应, 而且重复性较好。ddPCR 已经被广泛应用于各种研究, 如病原体诊断^[33]、基因突变检测^[34]和转基因研究^[35]等, 具有较好的应用前景。相比于普通 PCR 和 qPCR, ddPCR 具有更高的检测灵敏度, 其敏感性更强, 特异性更高, 且无需标准品, 也不依赖于标准曲线, 实现绝对定量, 在低浓度病毒含量的早期感染或潜伏感染的诊断中更加具有潜力, 但该方法需要使用昂贵的仪器设备和试剂的成本较高, 不适合大规模样品的检测。

2.4.4 LAMP

LAMP 技术是在恒温条件下即可完成的核酸扩增方法, 操作简单、不需要特殊仪器设备, 可在短时间内肉眼判读结果, 并且检测成本远低于荧光定量, 可以满足基层兽医实验室和养殖场临床快速诊断的需要。James 等^[36]基于拓扑异构酶 II 基因建立了 LAMP 分析法, 并且通过反应产物的限制性内切酶消化证实了其特异性, 检测限为 330 拷贝。田纯见等^[37]利用高度保守的非结构 DNA 聚合酶 *G121l*r 基因, 制备质粒标准品, 建立实时荧光 LAMP 方法, 检测 ASFV 核酸灵敏度达到 10^{-5} , 相当于每个反应体系可

以检出 21pg 病毒 DNA。Wang 等^[38]设计了针对 ASFV P10 基因的 LAMP 引物, 用包含 P10 基因序列的质粒 pUC57 优化了 LAMP 反应系统, 检测限为 30 拷贝。

2.4.5 RPA

RPA 是一种等温 DNA 扩增用于检测核酸的新技术, RPA 反应在恒定温度 (25~42 °C) 下即可进行, 不需要昂贵的热循环仪, 并且可在 30min 内完成对靶基因指数级的扩增。与 qPCR 相比, 具有简单、经济、快速的优点。王建昌^[39]等基于 ASFV P72 基因建立了一种 ASFV 的 RPA 检测方法。结果表明, 所建立的 RPA 方法在 38 °C 水浴锅中恒温反应 30 min, 即可实现对目的片段的有效扩增, 检测限达到 10^{-2} 拷贝。哈登楚日亚等^[40]针对 ASFV P72 基因的 *B646l* 片段设计了 3 组引物和探针, 并进行筛选、反应条件优化、灵敏性、特异性和重复性试验, 建立了实时荧光 RPA 方法。结果显示, 该方法在 39 °C、20 min 内即可检测 10 个拷贝的 DNA 分子。吴映彤等^[41]针对 *Mgf360-12l* 基因序列建立 RPA 等温检测方法。结果表明, 所建立的 RPA 方法于 35 °C 恒温反应 30 min, 即可实现对目的片段的稳定扩增, 检测限达到 10^3 个拷贝。RPA 反应的产物可通过侧向流试纸条、生物芯片、凝胶电泳、荧光检测仪等方法检测, 可满足疫病快速现场检测的需求。

3 血清学抗体检测技术

3.1 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是 OIE 指定的 ASF 首选血清学诊断方法, 其方便快捷、敏感特异, 并可使用自动化设备检测大量样本, 为目前最广泛的血清学检测技术。国内外常用来检测 ASFV 抗体的抗原蛋白有 P73、P72、P54、P32/P30 等, ELISA 方法通过这些蛋白能够直接检测出感染猪抗体。

Wardley 等^[42]在 1979 年首次使用 ELISA 鉴别 ASFV 抗原和抗体, 采用抗 ASFV 的特异性血清 IgG 作为包被蛋白, 建立了间接 ELISA 方法, 能够检测到 50~500 HAD50/mL 的有限抗原浓度。Bergeron 等^[43]评估了 OIE 推荐的 Ingezim PPA COMPAC ELISA, 使用了在美国收集的样本的综合队列 ($n=1791$), 该方法测定的诊断特异性确定为 99.4%。Nieto-Pelegrín 等^[44]使用基于半纯化病毒蛋白 P72 或在哺乳动物细胞中表达的纯化重组 P30 的间接 ELISA 分析粪便样品, 结果表明, 两次间接 ELISA 的血清样品结果与粪便样品结果一致, 为野猪种群的采样提供了一种可行的非侵入性替代方法。目前国内以间接 ELISA 检测方法研究较多, 王召阳等^[45]利用原核表达系统成功表达了重组蛋白 REP153R, 并制备了特异性鼠源多克隆抗体, 结果表明, 制备的抗 REP153R 多克隆抗体效价高达 1:128000, 且具有较好的特异性。邬旭龙等^[46]以原核表达 ASFV PK205R 重组蛋白为包被抗原, 通过反应条件优化,

建立了一种快速的 ASFV 间接 ELISA 检测方法, 结果显示检测灵敏度为 1:2560; 批内和批间重复性试验的变异系数均小于 10%。郭晶等^[47]建立以重组多表位融合蛋白 REME-P72 为包被抗原, 抗原包被浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 一抗、二抗稀释倍数分别为 1:200、1:5 000 倍的 ASFV 间接 ELISA 检测方法, 方法特异性和敏感性良好。

3.2 胶体金免疫层析技术

胶体金免疫层析技术(gold immune chromatography assay, GICA)结合了抗体抗原反应的高特异性和纳米胶体金颗粒显色的优势, 结果具有可视化, 不需借助仪器即可通过肉眼判定结果的优势具有操作简单、特异性强、灵敏度高、判读结果简便等优点, 而且, 判定结果无需设备或仅需简单设备, 适合基层快检室或者现场使用。张鑫宇等^[48]建立的 P54 抗体检测胶体金免疫层析试纸, 检测

结果表明, 该试纸条的敏感性为 200 ng/mL , 对 ASFV 抗体阳性猪血清具有高度特异性, 与猪其他病毒抗体阳性血清无交叉反应, 在 ASF 防控中具有良好的应用前景。吴海涛等^[49]建立的试纸条可在 5~10 min 内准确检测出 2 种抗原, 对 2 种抗原的最低识别量分别为 15 和 21 ng。林彦星等^[50]采用量子点作为标记材料对葡萄球菌蛋白 A(SPA)进行标记, 以抗 SPA 的多克隆抗体作为质控线的包被蛋白, 制备快速检测 ASFV 抗体的量子点免疫层析试纸条。结果表明, 所制备的试纸条与常见相关猪疫病阳性血清无交叉反应, 与进口 ELISA 试剂盒对临床样品的检测符合率为 100%。

4 方法比对

各检测技术的优缺点如表 1 所示。

表 1 非洲猪瘟检测方法优缺点比较
Table 1 Comparison of advantages and disadvantages of African swine fever detection methods

检测方法	前处理	灵敏度	专一性	操作	耗材	成本
GICA	简单	低	弱	简便	少	低
ELISA	简单	低	弱	简便	少	低
LAMP	简单	较高	较强	简便	少	低
RPA	简单	较高	较强	简便	少	低
PCR	简单	高	强	较复杂	多	高
qPCR	简单	高	强	简便	少	高
ddPCR	复杂	最高	强	复杂	多	最高
FAT	复杂	高	较强	复杂	多	低

5 结论与讨论

本文就目前快速诊断技术在 ASF 检测中的应用进行了综述, 鉴于目前尚无有效的治疗 ASF 方法, 也无有效的疫苗预防, 为防止疫病的传播, 可靠、快速的早期诊断对于实施严格的卫生和生物安全措施必不可少。现阶段 ASFV 检测主要分为病原学检测和血清学抗体检测。其中 qPCR、LAMP、GICA、ELISA 等技术在近几年应用较广泛, 可以对 ASF 起到早期快速检测的作用, 发展前景较好。GICA 和 ELISA 技术虽然快速经济, 但是相较于 qPCR 技术灵敏度较低, 一般用于初步诊断, 适用于基层检测。LAMP 和 RPA 等温扩增检测技术, 具有快速简便, 仪器简单等特点, 适用于现场检测。qPCR 技术快速灵敏, 是目前实验室检测最常用的方法。在基层快检室或者现场检测情况下, 可用 LAMP 进行替代。在实际检测当中, 应当根据各种方法的优缺点, 选择合适方法进行检测, 也可将多种诊断方法联合应用, 各取所长。

参考文献

- [1] Erik A, Astghik H, Armen K, *et al.* Genistein inhibits African swine fever virus replication in vitro by disrupting viral DNA synthesis [J]. *Antiviral Res.* 2018, 156(2018): 128–137.
- [2] Pietschmann J, Mur L, Blome S, *et al.* African swine fever virus transmission cycles in Central Europe: Evaluation of wild boar-soft tick contacts through detection of antibodies against *Ornithodoros erraticus* saliva antigen [J]. *BMC Veter Res.* 2016, 12(1): 1–5.
- [3] Chen Z, Xu X, Wang Y, *et al.* DNA segments of African Swine Fever Virus detected for the first time in hard ticks from sheep and bovines [J]. *Syst Appl Acarol.* 2019, 24(1): 180.
- [4] Quembo CJ, Jori F, Vosloo W, *et al.* Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype [J]. *Transbound Emerg Dis.* 2018, 65(2): 420–431.
- [5] Zhao D, Liu R, Zhang X, *et al.* Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China [J]. *Emerg Microbes Infect.* 2019, 8(1): 438–447.
- [6] Salas ML, Andrés G. African swine fever virus morphogenesis [J]. *Virus*

- Res, 2013, 173(1): 29–41.
- [7] Galindo I, Alonso C. African Swine Fever Virus: A Review [J]. Viruses, 2017, 9(5): 103.
- [8] Wang N, Zhao D, Wang J, *et al.* Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly [J]. Science, 2019, 366(6465): 640–644.
- [9] Guinat C, Gogin A, Blome S, *et al.* Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions [J]. Veter Rec, 2016, 178(11): 262–267.
- [10] Alkhamis M A, Carmina G, Cristina J, *et al.* Phylodynamics and evolutionary epidemiology of African swine fever P72-CVR genes in Eurasia and Africa [J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0192565.
- [11] Sargsyan MA, Voskanyan HE, Karalova EM, *et al.* Third wave of African swine fever infection in Armenia: Virus demonstrates the reduction of pathogenicity [J]. Veter World, 2018, 11(1): 5–9.
- [12] 王清华, 任炜杰, 包静月. 我国首例非洲猪瘟的确诊[J]. 中国动物检疫, 2018, 35(9): 1–4.
Wang QH, Ren WJ, Bao JY. The first diagnosis of African swine fever in China [J]. Chin Anim Health Inspect, 2018, 35(9): 1–4.
- [13] Zhou X, Li N, Luo Y, *et al.* Emergence of African swine fever in China, 2018 [J]. Transbound Emerg Dis, 2018, 65(6): 1482–1484.
- [14] 张志, 康京丽, 李晓成. 非洲猪瘟的流行特征和传播路线 [J]. 中国动物检疫, 2018, 35(11): 48–51.
Zhang Z, Kang JL, Li XC. Epidemic characteristics and transmission routes of African swine fever [J]. Chin Anim Health Inspect, 2018, 35(11): 48–51.
- [15] Lopera-Madrid J, Osorio J E, He Y, *et al.* Safety and immunogenicity of mammalian cell derived and Modified Vaccinia Ankara vectored African swine fever subunit antigens in swine [J]. Veter Immunol Immunopathol, 2017, 185(3): 20–33.
- [16] Revilla Y, Pérez-Núñez D, Richt JA. African swine fever virus biology and vaccine approaches [J]. Adv Virus Res, 2018, 100: 41.
- [17] Zakaryan H, Revilla Y. African swine fever virus: Current state and future perspectives in vaccine and antiviral research [J]. Veter Microbiol, 2016, (185): 15–19.
- [18] Malmquist WA, Hay D. Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures [J]. Am J Veter Res, 1960, 21(21): 104–108.
- [19] Colgrove GS, Haelterman EO, Coggins L. Pathogenesis of African swine fever in young pigs [J]. Am J Veter Res, 1969, 30(8): 1343–1359.
- [20] Basto AP, Portugal RS, Nix RJ, *et al.* Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus* [J]. Cancer Invest, 2006, 7(5): 493–507.
- [21] 曾少灵, 花群义, 张彩虹, 等. 非洲猪瘟病毒 PCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2010, 30(9): 1173–1178
Zeng SL, Hua QY, Zhang CH, *et al.* Development of a PCR detection method for African swine fever virus [J]. Prog Veter Med, 2010, 30(9): 1173–1178.
- [22] WS/T 230-2002. 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用[S].
WS/T 230-2002. Application of polymerase chain reaction (PCR) technology in clinical diagnosis [S].
- [23] Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [M]. World Organisation for Animal Health, 2018.
- [24] Tignon M, Gallardo C, Iscaro C, *et al.* Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus [J]. J Virol Methods, 2011, 178(1–2): 161–170.
- [25] Luo Y, Atim SA, Shao L, *et al.* Development of an updated PCR assay for detection of African swine fever virus [J]. Arch Virol, 2017, 162(1): 191–199.
- [26] 张彩虹, 杨俊兴, 林彦星, 等. 非洲猪瘟病毒免提取核酸荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2019, 49(10): 1216–1221.
Zhang CH, Yang JX, Lin YX, *et al.* Development of a direct real-time PCR assay freed from DNA extraction for detection of African swine fever virus [J]. Chin Veter Sci, 2019, 49(10): 1216–1221.
- [27] Wang A, Jia R, Liu Y, *et al.* Development of a novel quantitative real-time PCR assay with lyophilized powder reagent to detect African swine fever virus in blood samples of domestic pigs in China [J]. Transbound Emerg Dis, 2019, 67(1): 1–14.
- [28] 崔贝贝, 李霆, 仇松寅, 等. 非洲猪瘟病毒 *E184L* 基因实时荧光定量PCR检测方法的建立 [J]. 动物医学进展, 2020, 41(1): 8–14.
Cui BB, Li T, Qiu SY, *et al.* Establishment of real-time quantitative PCR assay for detection of African swine fever virus *E184L* gene [J]. Prog Veter Med, 2020, 41(1): 8–14.
- [29] 崔贝贝, 仇松寅, 梅琳, 等. 非洲猪瘟病毒 *K196R* 基因实时荧光定量PCR检测方法的建立 [J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(5): 3–8.
Cui BB, Qiu SY, Mei L, *et al.* Establishment of real-time quantitative PCR assay for detection of African swine fever virus *K196R* gene [J]. Chin J Veter Med, 2019, 55(5): 3–8.
- [30] 王建华, 赵祥平, 董志珍, 等. 一种鉴别非洲猪瘟病毒和高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒二重荧光 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(1): 19–25.
Wang JH, Zhao XP, Dong ZZ, *et al.* Development of a duplex TaqMan-MGB real-time RT-PCR assay for differentiation of African swine fever virus from highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Chin Veter Sci, 2016, 46(1): 19–25.
- [31] 郭旭龙, 肖璐, 宋勇, 等. 非洲猪瘟病毒微滴数字 PCR(ddPCR)方法的建立及应用[J]. 微生物学通报, 2017, 44(12): 2839–2846.
Wu XL, Xiao L, Song Y, *et al.* A novel high-sensitivity droplet digital PCR (ddPCR) for detection of African swine fever virus [J]. Microbiol China, 2017, 44(12): 2839–2846.
- [32] 原霖, 董浩, 倪建强, 等. 非洲猪瘟病毒微滴数字 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(7): 81–84.
Yuan L, Dong H, Ni JQ, *et al.* Development of droplet digital PCR for detection of African swine fever virus [J]. Anim Husband Veter Med, 2019, 51(7): 81–84.
- [33] Tagliapietra A, Rotondo JC, Bononi I, *et al.* Droplet digital PCR assay to detect Merkel cell polyomavirus sequences in chorionic villi from spontaneous abortion affected females [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(3): 1888–1894.
- [34] Brambati C, Galbiati S, Xue E, *et al.* Droplet digital polymerase chain reaction for DNMT3A and IDH1/2 mutations to improve early detection of acute myeloid leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Haematologica, 2016, 101(4): 157–161.
- [35] Gerdes L, Iwobi A, Busch U, *et al.* Optimization of digital droplet polymerase chain reaction for quantification of genetically modified

- organisms [J]. *Biomol Detect Quan*, 2016, (7): 9–20.
- [36] James HE, Ebert K, Mcgonigle R, *et al.* Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification [J]. *J Virol Methods*, 2010, 164(1): 68–74.
- [37] 田纯见, 杨舒展, 段喻燕, 等. 非洲猪瘟病毒非结构基因实时荧光 LAMP 检测方法的建立 [J]. *动物医学进展*, 2017, 38(11): 5–9.
Tian CJ, Yang SZ, Duan YY, *et al.* Establishment of a real-time fluorescent LAMP detection method for non-structural genes of African swine fever virus [J]. *Prog Veter Med*, 2017, 38(11): 5–9.
- [38] Wang D, Yu J, Wang Y, *et al.* Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and visual LAMP assay for detection of African swine fever virus (ASFV) [J]. *J Virol Methods*, 2020, 276(1): 113–775.
- [39] 王建昌, 王金凤, 刘立兵, 等. 非洲猪瘟病毒 RPA 等温检测方法的建立[J]. *中国动物检疫*, 2016, 33(7): 78–81, 94.
Wang JC, Wang JF, Liu LB, *et al.* Rapid and sensitive detection of african swine fever virus by recombinase polymerase amplification [J]. *Chin Anim Health Inspect*, 2016, 33(7): 78–81, 94.
- [40] 哈登楚日亚, 樊晓旭, 赵永刚, 等. 非洲猪瘟病毒实时荧光重组酶聚合酶扩增技术(RPA)检测方法的建立 [J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(11): 3270–3277.
Hadeng CRY, Fan XX, Zhao YG, *et al.* Establishment of a real-time fluorescent recombinase polymerase amplification (RPA)for the detection of African swine fever virus [J]. *Chin Anim Husband Veter Med*, 2017, 44(11): 3270–3277.
- [41] 吴映彤, 王西西, 吴竞, 等. 非洲猪瘟病毒多基因家族成员 MGF360-12L RPA 检测方法的建立[J]. *中国动物传染病学报*, 2020, 28(2): 20–25.
Wu YT, Wang XX, Wu J, *et al.* Development of recombinase polymerase amplification assay for detection of African swine fever virus MGF360-12L [J]. *Chin J Anim Infect Dis*, 2020, 28(2): 20–25.
- [42] Wardley RC, Elzein EMEA, Crowther JR, *et al.* A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay for the detection of African swine fever virus antigen and antibody [J]. *J Hyg*, 1979, 83(2): 363.
- [43] Bergeron HC, Glas PS, Schumann KR. Diagnostic specificity of the African swine fever virus antibody detection enzyme-linked immunosorbent assay in feral and domestic pigs in the United States [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 2(3): 11–18.
- [44] Nieto PE, Rivera AB, Sánchez VJM. First detection of antibodies against African swine fever virus in faeces samples [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2015, 62(6): 594–602.
- [45] 王召阳, 林伟东, 刘雪婷, 等. 非洲猪瘟病毒 EP153R 蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(4): 1163–1171.
Wang ZY, Lin WD, Liu XT, *et al.* Prokaryotic expression of African swine fever virus EP153R protein and preparation of its polyclonal antibody [J]. *Chin Anim Husband Veter Med*, 2020, 47(4): 1163–1171.
- [46] 郭旭龙, 彭彬, 姜睿蛟, 等. 以原核表达的非洲猪瘟病毒 pK205R 蛋白为包被抗原的间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(10): 800–803.
Wu XL, Peng B, Jiang RJ, *et al.* Establishment of indirect ELISA antibody detection method using prokaryotic expression of African swine fever virus pK205R protein as coating antigen [J]. *Chin J Prev Veter Med*, 2016, 38(10): 800–803.
- [47] 郭晶, 孟庆玲, 乔军, 等. ASFV 多表位融合基因 MeP72 基因的克隆、表达及其间接 ELISA 检测方法建立[J]. *生物技术*, 2018, 28(6): 548–553.
Guo J, Meng QL, Qiao J, *et al.* Expression of multi epitope fusion antigen gene MeP72 of ASFV in *Pichia pastoris* and establishment of an indirect ELISA assay [J]. *Biotechnol Bull*, 2018, 28(6): 548–553.
- [48] 张鑫宇, 左伟勇, 朱善元, 等. 非洲猪瘟病毒 p54 抗体胶体金试纸检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 36(4): 33–37.
Zhang XY, Zuo WY, Zhu SY, *et al.* Establishment of a colloidal gold test strip for detection of African swine fever virus p54 antibody [J]. *Chin J Prev Veter Med*, 2016, 36(4): 33–37.
- [49] 吴海涛, 成大荣, 吴萌, 等. 非洲猪瘟病毒胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018, (17): 126–128, 238.
Wu HT, Cheng DR, Wu M, *et al.* Development of test strips for African swine fever virus colloidal gold immunochromatography[J]. *Heilongjiang Anim Sci Veter Med*, 2018, (17): 126–128, 238.
- [50] 林彦星, 曹琛福, 张彩虹, 等. 非洲猪瘟病毒抗体量子点检测试纸条的研制[J]. *中国兽医科学*, 2017, 47(10): 1214–1220.
Lin YX, Cao CF, Zhang CH, *et al.* Establishment of a quantum dots-based immunochromatographic strip for detection of the antibodies against African swine fever virus [J]. *Chin Veter Sci*, 2017, 47(10): 1214–1220.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



王梓莹, 硕士, 主要研究方向为营养与食品安全。

E-mail: 657866791@qq.com



何庆华, 博士, 副教授, 主要研究方向为营养与食品安全。

E-mail: qinghua.he@szu.edu.cn